

UTILISATION THERAPEUTIQUE DE TRANSFERT DE GENE PAR VECTEUR
RETROVIRAL DANS DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES CIRCULANTES:
ETABLISSEMENT D'UN MODELE PRE-CLINIQUE MURIN ET DEFINITION DES
CONDITIONS IN VITRO DE TRANSFECTION PAR RETROVIRUS DES CELLULES
SOUCHES HUMAINES.

Nous avons publié la première étude clinique prospective et randomisée concernant l'intérêt de l'intensification thérapeutique sous couvert d'autogreffe de moelle osseuse dans le cancer anaplasique à petites cellules (1) et défini les conditions de concentration des cellules souches hématopoïétiques médullaires (2). Après autogreffe, il existe un déficit immunitaire pouvant persister plus d'un an. Nous avons démontré que la capacité de prolifération des lymphocytes T réduite après greffe peut être restaurée *in vitro* par l'Interleukine-2 (IL-2) (3). Nous avons également observé que la production d'IL-2 par les lymphocytes T est diminuée de même que la production de l'ARNm de l'IL-2 par rapport aux contrôles normaux (4). De même l'élévation du calcium intra-cellulaire suivant stimulation par concanavalin A est réduite (5). Nous avons ensuite montré que l'administration systémique d'IL-2 ne corrige que partiellement ces déficits chez les greffés (6).

Les cellules souches hématopoïétiques périphériques permettent une reprise après greffe plus rapide que les cellules médullaires. Notre équipe cherche à optimiser les schémas d'administration de facteurs de croissance après chimiothérapie permettant d'obtenir les meilleures collectes de cellules souches périphériques par leucaphérèse (7). Les caractéristiques biologiques des cellules souches et leur abondance en font des cibles idéales pour un transfert de gène par vecteurs rétroviraux. Dans un modèle murin préclinique, nous tenterons de corriger le déficit immunitaire après greffe en introduisant, grâce à un rétrovirus, le gène de l'IL-2 ou du CD4 dans des cellules souches périphériques murines. Nous définirons également *in vitro* les conditions optimales de transfection par rétrovirus de cellules souches périphériques humaines collectées en vue d'une greffe.

REFERENCES

1. Humblet Y, Symann M. et al.
Late intensification chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in selected small cell carcinoma of the lung : a randomized study.
J. Clin. Oncol. 1987; 5:1864-1873.
2. Humblet Y. et al.
Concentration of bone marrow progenitor cells by separation on a percoll gradient using the haemonetic model 30.
Bone Marrow Transplant. 1988; 3:63-67.
3. Bosly A and Symann M.
Recombinant human interleukin-2 restores *in vitro* T cell colonies formation by peripheral blood mononuclear cells after autologous bone marrow transplantation.
Exp. Hematol. 1987; 15:1048-1054.
4. Guillaume T, Hamdan O, Sekhvat M, Staquet P, Bosly A, Humblet Y, Doyen C, Symann M. T-cell unresponsiveness in recipients of autologous bone marrow transplants (ABMT) : Analysis of defective signal transduction and IL-2 message transcription.
Blood 80 (suppl. 1) : 140a, 1992
5. Guillaume T, Hamdan O, Staquet P, Sekhvat M, Bosly A, Humblet Y, Doyen C, Coiffier B, Felman P, Symann M.
Blunted rise in intracellular calcium in CD4+ T cells in response to mitogen following autologous bone marrow transplantation.
British Journal of Hematology, 1993, In press.
6. Bosly A, Guillaume T, Brice P, Humblet Y, Staquet P, Doyen C, Chatelain B, Franks C, Gisselbrecht C, Symann M.
Effects of escalating doses of recombinant human IL-2 in correcting functional T-cell defects following autologous bone marrow transplantation for lymphoma and solid tumors.
Exp. Hematol. 20: 962-968, 1992.
7. Guillaume T, D'Hondt V, Symann M.
Peripheral blood stem cell harvesting with IL-3.
Int. J. Cell Cloning. 1993. In press

2023251783

L'existence d'une relation dose-réponse en chimiothérapie anticancéreuse est le point de départ des essais cliniques d'escalade de dose, encore appelés "intensification thérapeutique". La toxicité limitante de la plupart des agents cytostatiques étant la myélotoxicité, les intensifications thérapeutiques se pratiquent sous le couvert d'auto- ou d'allo-greffe de cellules souches hématopoïétiques afin de prévenir une aplasie médullaire irréversible. Notre équipe est la première à avoir publié une étude clinique prospective et randomisée concernant l'intérêt de l'intensification thérapeutique dans le cancer bronchique anaplasique à petites cellules (1) et aujourd'hui les chimiothérapies intensives avec autogreffe de cellules souches hématopoïétiques sont activement investiguées dans le traitement des leucémies, des lymphomes, des cancers du sein, du testicule ainsi que de l'ovaire (2).

La chimiothérapie intensive suivie de greffe de cellules souches hématopoïétiques qui ne comprennent qu'un nombre limité de précurseurs lymphoïdes a pour conséquence d'induire chez les malades une immunosuppression prolongée, de plus d'un an, contribuant vraisemblablement aux infections opportunistes et aux rechutes tumorales fréquemment rencontrées chez les malades ainsi traités. Notre équipe a contribué à la caractérisation de ce déficit immunitaire (diminution du pourcentage et du nombre absolu de cellules T CD4+, augmentation du nombre absolu et relatif des cellules NK CD56+, déficit lymphoprolifératif T, déficit de production d'IL-2) et au développement de ses moyens de correction (3,4). L'utilisation systémique d'IL-2 comme immunothérapie adjuvante après intensification thérapeutique et greffe de cellules souches hématopoïétiques produit des effets biologiques intéressants sur les cellules NK CD56+ mais peu marqués en ce qui concerne les lymphocytes T (5). En raison de la toxicité de l'IL-2, ce traitement n'est pas sans risque et son application au long cours est difficilement praticable.

On trouve chez l'homme comme chez la souris des cellules souches capables de repeupler le système hématopoïétique après agression léthale, dans le foie de fœtus, dans le sang de cordon ombilical, dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique de l'adulte (6). L'utilisation de cellules souches hématopoïétiques du sang périphérique est aujourd'hui activement investiguée (projet interuniversitaire FRSM 74.583.92) en raison de leurs propriétés intéressantes en ce qui concerne la cinétique de régénération hématopoïétique après greffe ou en raison de leur collecte facile par leucaphérèses pratiquées en période de régénération hématopoïétique post-chimiothérapique après administration de facteurs de croissance hématopoïétiques. Les cellules souches ainsi collectées présentent une propriété biologique intéressante supplémentaire : une haute proportion d'entre elles est activement engagée dans le cycle de prolifération cellulaire ce qui en fait des cibles idéales pour transfection par vecteur rétroviral (7) contenant par exemple le gène de l'IL-2 ou le gène du CD4.

Le choix des cellules souches périphériques pour tentative de correction du déficit immunitaire post-greffe par transfert de gène apparaît encore plus judicieux si l'on considère que les leucaphérèses pratiquées après chimiothérapie et stimulation hématopoïétique collectent une fraction déjà concentrée *in vivo* (jusqu'à 20% des cellules mononucléées ainsi collectées sont CD34+) (8). De plus ces progéniteurs hématopoïétiques sont relativement plus mûrs que ceux de la moelle osseuse, ce qui explique qu'une bonne proportion d'entre eux est appelée à s'éteindre dans les mois qui suivent la greffe. Il s'agit là d'une propriété intéressante à exploiter si l'on souhaite que l'expression du gène greffé s'amenuise avec le temps après la greffe. En revanche, la question de la reprise hématopoïétique à long terme dans les cas de greffes pratiquées avec les seules cellules souches hématopoïétiques périphériques n'est pas encore résolue (9) et la contribution de ce type de greffon à l'hématopoïèse post-greffe devrait trouver une réponse au travers du type de manipulation que nous envisageons.

Dans une étude clinique réalisée par notre groupe (5), l'administration d'IL-2 augmente l'activité des cellules NK CD56+ jusqu'à 2 semaines après arrêt de la thérapeutique mais ne restaure pas de manière significative les capacités de prolifération des lymphocytes T, contrairement à ce que nous avons observé *in vitro* (3). On peut espérer que la transfection d'un gène d'IL-2 ou de CD4 dans des cellules souches périphériques greffées entraînera un effet biologique et clinique plus marqué car le récepteur de l'IL-2 est normalement exprimé à la surface des lymphocytes T qui réapparaissent dans le sang après transplantation de cellules souches. Par ailleurs, l'importance de la majoration de l'activité cytotoxique non MHC-restreinte dans un contexte de maladie résiduelle n'est pas clairement établie; toutefois pour plusieurs types de

2023251784

tumeurs, l'utilisation d'IL-2 associée ou non à l'administration de lymphocyte activated killer (LAK) ou tumor infiltrating lymphocyte (TIL) s'est révélée capable d'induire des regressions tumorales (10). Il apparaît que l'IL-2 joue un rôle central dans le déficit immunitaire après autogreffe et dans l'immunothérapie adoptive anticancéreuse, ce qui justifie pleinement l'emploi de cette cytokine dans notre modèle.

Les lymphocytes T helper, principaux producteurs d'IL-2, sont classiquement caractérisés par leur phénotype CD4. La population CD4+ est nettement réduite chez les patients autogreffés et cette diminution du nombre absolu de cellules CD4+ explique en partie le déficit de sécrétion d'IL-2. Le rôle de la molécule d'adhésion CD4 n'est pas entièrement élucidé. Son intégrité apparaît nécessaire pour une réponse immunitaire normale, car elle interagit avec certaines tyrosine kinases liées au complexe récepteur T. Elle permettrait d'amplifier la production d'IL-2. De plus, la présence à faible densité de l'antigène CD4 décrite à la surface des cellules pluripotentes hématopoïétiques suggère que cette molécule joue également un rôle dans l'hématopoïèse au sens large. Les effets de la transfection du gène encodant la molécule CD4 dans les cellules souches hématopoïétiques seront également très intéressants à investiguer.

BUT DU PROJET

L'objectif de ce travail est d'une part de développer un modèle pré-clinique de transfection de cellules souches hématopoïétiques murines avec des vecteurs rétroviraux contenant le gène de l'IL-2 ou du CD4 afin de tester les aspects de faisabilité, de toxicité et le retentissement de ces manipulations sur la reconstitution immunitaire et la régénération hématopoïétique au long cours après greffe. Les vecteurs seront, si nécessaire, rendus plus contrôlables par l'adjonction d'un gène-suicide comme, par exemple, le gène de la cytosine déaminase qui convertit la 5-fluorocytosine non toxique en 5-fluorouracil cytotoxique (11). Ceci permettrait d'éliminer les cellules transfectées en cas d'accident non anticipé.

D'autre part, le projet a pour but la production de vecteurs rétroviraux totalement dépourvus de particules virales recombinantes et de tester la possibilité de transfecter, *in vitro*, des cellules souches périphériques humaines collectées dans des conditions similaires à celles d'un protocole clinique.

Une éventuelle application clinique ferait bien sûr l'objet d'une demande d'avenant au présent projet et ne serait envisagée qu'après obtention préalable des autorisations requises pour une telle expérience.

APPROCHE EXPERIMENTALE

A. ETABLISSEMENT D'UN MODELE MURIN

1. Production de rétrovirus contenant le cDNA de l'IL-2 ou du CD4

a) Construction des vecteurs rétroviraux

Le plasmide M5-néo contenant un gène de résistance à la généticine (G418) est un excellent vecteur pour l'expression de gène dans les cellules hématopoïétiques (12). Le cDNA de l'IL-2 ou du CD4 sera inséré dans le site du clonage EcoRI de M5-néo. Les séquences de polyadénylation de ces cDNA seront préalablement excisées car elles provoquent une chute drastique du taux de rétrovirus produit. L'orientation correcte du cDNA sera vérifiée en digérant le plasmide par enzyme de restriction.

b) Production de particules rétrovirales

Le plasmide sera transfecté dans la lignée d'emballage ecotrope GP+E86 (13) par la technique classique de co-précipitation au phosphate de calcium. Cette lignée produit, *in trans*, les protéines dérivées des gènes *gag*, *pol*, et *env* nécessaires à la production de particules rétrovirales. Le surnageant rétroviral produit par cette lignée servira à l'infection de la lignée amphotropique GP+envAm12.

2023251785

- c) **Détermination du titre rétroviral**
Les cellules NIH 3T3 seront infectées avec le surnageant viral produit par cellules d'emballage GP+E86 ou GP+envAm12. Seules les NIH 3T3 ayant intégré le virus et donc le gène de résistance au G418, survivront après introduction de l'antibiotique dans le milieu. Le titre viral correspond au nombre de colonies formées par millilitre de surnageant viral.
- d) **Recherche de rétrovirus recombinant infectieux**
Les surnageants de NIH 3T3 infectées par rétrovirus et sélectionnées par G418 serviront à infecter des NIH 3T3 fraîches et celles-ci seront à nouveau sélectionnées avec du G418. En l'absence de rétrovirus recombinant ces cellules ne survivront pas.

2. Etablissement du modèle animal

- a) **Infection des cellules souches périphériques**
Nous utiliserons des souris C3H/HeJ car cette race a été fréquemment utilisée dans les expériences de transfert de gène par rétrovirus en raison du faible risque d'apparition de rétrovirus recombinant xénotrope chez ces animaux. Les cellules souches hématopoïétiques de ces souris seront collectées après chimiothérapie et rhG-CSF par section brachiale ou ponction cardiaque sous anesthésie générale (14). Ces cellules seront préstimulées pendant 48 heures par de l'interleukine-6 et du Stem Cell Factor pour augmenter la mise en cycle cellulaire (15) et mises ensuite durant 48 h en présence de la lignée productrice de virus préalablement irradiée. Les cellules hématopoïétiques non adhérentes seront injectées à des souris syngéniques irradiées à dose léthale.
- b) **Suivi après greffe**
A court terme, nous surveillerons les paramètres hématologiques (globules blancs et plaquettes) par ponction rétro-orbitaire. La persistance du gène rétroviral dans les cellules hématopoïétiques périphériques et médullaires sera évaluée par polymérase chain reaction et son expression par Elisa pour l'IL-2 et par cytométrie de flux pour le CD4. A plus long terme, la survenue éventuelle de lymphomes suite à une stimulation du type autocrine par l'IL-2 sera évaluée par suivi clinique et examen anatomopathologique des rates et moelles des animaux sacrifiés à des temps déterminés de l'expérience.

B. DEFINITION DES CONDITIONS D'INFECTION IN VITRO DES CELLULES SOUCHES PERIPHERIQUES HUMAINES

Nous disposons d'une lignée cellulaire (PA317) produisant des rétrovirus (N2) conférant la résistance au G418 à de hauts titres et déjà utilisés dans plusieurs protocoles cliniques (16). Le titre rétroviral sera estimé et l'absence de virus recombinant sera évaluée. Des cellules souches périphériques humaines fraîchement collectées après chimiothérapie suivie de facteur de croissance seront infectées par le surnageant viral filtré car la technique de co-culture n'est pas applicable en clinique en raison des risques de contamination par les cellules murines. Les cellules souches périphériques seront donc exposées au surnageant viral durant des temps à déterminer et l'infection des cellules sera contrôlée par culture clonale en méthylcellulose avec ou sans G418. Les colonies résistantes seront isolées et la présence du gène de résistance au G418 sera certifiée par polymérase chain reaction.

REFERENCES

1. Humblet Y, Symann M. et al. J. Clin. Oncol. 5:1864-1873, 1987
2. Armitage JO and Antman K. "High Dose Cancer Therapy: Pharmacology, Hematopoietins, Stem cells", Williams and Wilkins, eds. Baltimore, Maryland USA, 1992
3. Bosly et al. Exp. Hematol. 15 : 1048-1054, 1987

2023251786

4. Cayeux et al. Blood 74:2270-2277, 1989
5. Bosly et al. Exp. Hematol. 20:962-968, 1992
6. Symann. Fetal hemopoiesis in diffusion chamber cultures. Thèse d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur 1979.
7. Bregni M, Gianni A et al. Blood 80 (6) 1418-1422, 1992
8. Bender JG. Int. J. Cell Cloning 10 : 79-84, 1992
9. Lowry P. et al. Exp. Hematol. 20 : 937-942, 1992
10. Rosenberg SA et al. J. Exp. Med. 161:1169, 1985
11. Mullen CA, Blaese M. PNAS USA 89:33, 1992
12. Laker C. et al. PNAS USA 84:8458-8462, 1987
13. Markowitz D. Virology 167:400-407, 1988
14. Molineux G, Dexter M. et al. Blood 76 (10) 2153-2158, 1990
15. Luskey BD et al. Blood 80 (2) 396-402, 1992
16. Dick JE et al. Blood 78 (3) 624-634, 1992

2023251787